

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Juni 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/46148 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07C 311/39,
C07D 213/42, 307/52, 333/20, A61K 31/18, A61P 9/10,
25/28, 35/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/13681

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. November 2001 (24.11.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 60 809.4 7. Dezember 2000 (07.12.2000) DE

(71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND
GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, 65929 Frankfurt
(DE).

(72) Erfinder: WEICHERT, Andreas; Leipziger Strasse
21, 63329 Egelsbach (DE). JANSEN, Hans-Willi; Dis-
telweg 25, 65527 Niedernhausen (DE). KLEEMANN,
Heinz-Werner; Mainstrasse 29, 65474 Bischofsheim
(DE). LANG, Hans-Jochen; Rüdesheimer Strasse 7,
65719 Hofheim (DE). RÜTTEN, Hartmut; Falkenweg
25, 65510 Idstein (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: SUBSTITUTED ANTHRANILIC ACIDS

(54) Bezeichnung: SUBSTITUIERTE ANTHRANILSÄUREN

(57) **Abstract:** The invention relates to anthranilic acids of formula (I) wherein the substituents R1-R3 have the designations cited in the claims. Said acids have no unwanted and detrimental salidiuretic properties, but rather very good cardioprotective properties, for example in terms of oxygen deficiency phenomena. Due to their pharmacological properties, said acids are highly suitable as cardioprotective pharmaceuticals for the prophylaxis and treatment of infarction, as well as the treatment of angina pectoris, also preventively inhibiting or strongly reducing the pathophysiological processes in the case of disorders caused by ischaemia. The protective action of the inventive compounds of formula (I) against pathological, hypoxic and ischaemic situations, and the inhibition of the cellular Na⁺/HCO₃ cotransporter (NBC), enables said compounds to be used as pharmaceuticals for treating all acute or chronic disorders caused by ischaemia, or diseases induced in a primary or secondary manner by said disorders.

(57) **Zusammenfassung:** Beschrieben werden Anthranilsäure der Formel (I) worin die Substituenten R1-R3 die in den Ansprüchen angegebenen Bedeutungen haben. Sie haben keine unerwünschten und nachteiligen salidiuretischen, jedoch sehr gute cardioprotektive Eigenschaften, beispielsweise bei Sauerstoffmangelerscheinungen. Sie sind infolge ihrer pharmakologischen Eigenschaften als cardioprotektive Arzneimittel zur Infarktprophylaxe und der Infarktbehandlung sowie zur Behandlung der angina pectoris hervorragend geeignet, wobei sie auch präventiv die pathophysiologischen Vorgänge beim Entstehen ischämisch induzierter Schaden inhibieren oder stark vermindern. Wegen ihrer schützenden Wirkungen gegen pathologische hypoxische und ischämische Situationen können die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I) infolge Inhibition des zellulären Na⁺/HCO₃-Cotransporters (NBC) als Arzneimittel zur Behandlung aller akuten oder chronischen durch Ischämie ausgelosten Schaden oder dadurch primär oder sekundär induzierten Krankheiten verwendet werden.

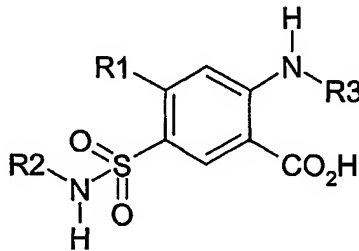


WO 02/46148 A1

SUBSTITUIERTE ANTHRANILSÄUREN

- 5 Substituierte Anthranilsäuren, ihre Verwendung als Medikament oder Diagnostikum, sowie sie enthaltendes Medikament, sowie ein pharmazeutisches Kombinationspräparat mit einem Natrium/Wasserstoff-Austausch (NHE)-Blocker

Die Erfindung betrifft Anthranilsäuren der Formel I



- 10 worin bedeuten:

R(1) H, Cl, Br, I, CN, (C₁-C₈)- Alkyl, (C₃-C₆)- Cycloalkyl oder Phenyl,

wobei der aromatische Kern unsubstituiert oder substituiert ist mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, (C₁-C₃)- Alkyl, Methoxy oder -(CF₂)_a-CF₃;

- 15 a Null, 1, 2 oder 3;

R(2) (C₁-C₈)- Alkyl, -C_bH_{2b}- (C₃-C₆)- Cycloalkyl, -C_bH_{2b}- Phenyl, -C_bH_{2b}- Pyridinyl, -C_bH_{2b}- Thiophenyl, -C_bH_{2b}- Furanyl,

wobei die aromatischen Systeme unsubstituiert oder substituiert sind mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)-Alkyl,

- 20 Methoxy oder -SO₂NR(4)R(5);

R(4) und R(5) unabhängig voneinander H, (C₁-C₄)-Alkyl,

- b Null, 1, 2, 3 oder 4;

R(3) -C_dH_{2d}- Phenyl,

2

wobei der aromatische Kern unsubstituiert oder substituiert ist mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl oder Methoxy;

d 3 oder 4;

5 sowie deren pharmazeutisch verträgliche Salze.

Bevorzugt sind Verbindungen der Formel I, in denen bedeuten:

R(1) Cl, (C₁-C₄)- Alkyl oder Phenyl,

10 wobei der aromatische Kern unsubstituiert oder substituiert ist mit 1-3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl oder Methoxy;

R(2) (C₁-C₄)- Alkyl, -C₆H_{2b}- Cyclohexyl, -C₆H_{2b}- Phenyl, -C₆H_{2b}- Pyridinyl, -C₆H_{2b}- Thiophenyl, -C₆H_{2b}- Furanyl,

15 wobei die aromatischen Systeme unsubstituiert oder substituiert sind mit 1 - 3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)-Alkyl, Methoxy oder -SO₂NH₂;

b Null, 1 oder 2;

R(3) -n-C₄H₈- Phenyl,

20 wobei das Phenyl unsubstituiert ist oder substituiert mit 1 - 3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl oder Methoxy;

sowie deren pharmazeutische verträgliche Salze.

Besonders bevorzugt sind Verbindungen der Formel I, in denen bedeuten:

25 R(1) Cl, (C₁-C₄)- Alkyl oder Phenyl,

wobei der aromatische Kern unsubstituiert oder substituiert ist mit 1-3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl oder Methoxy;

3

R(2) (C₁-C₄)- Alkyl, -C₆H_{2b}- Cyclohexyl, -C₆H_{2b}- Phenyl, -C₆H_{2b}- Pyridinyl, -
C₆H_{2b}- Thiophenyl, -C₆H_{2b}- Furanyl,

wobei die aromatischen Systeme unsubstituiert oder substituiert sind
mit 1 - 3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl, Methoxy oder -SO₂NH₂;

5

b 1;

R(3) -n-C₄H₈- Phenyl,

sowie deren pharmazeutisch verträgliche Salze.

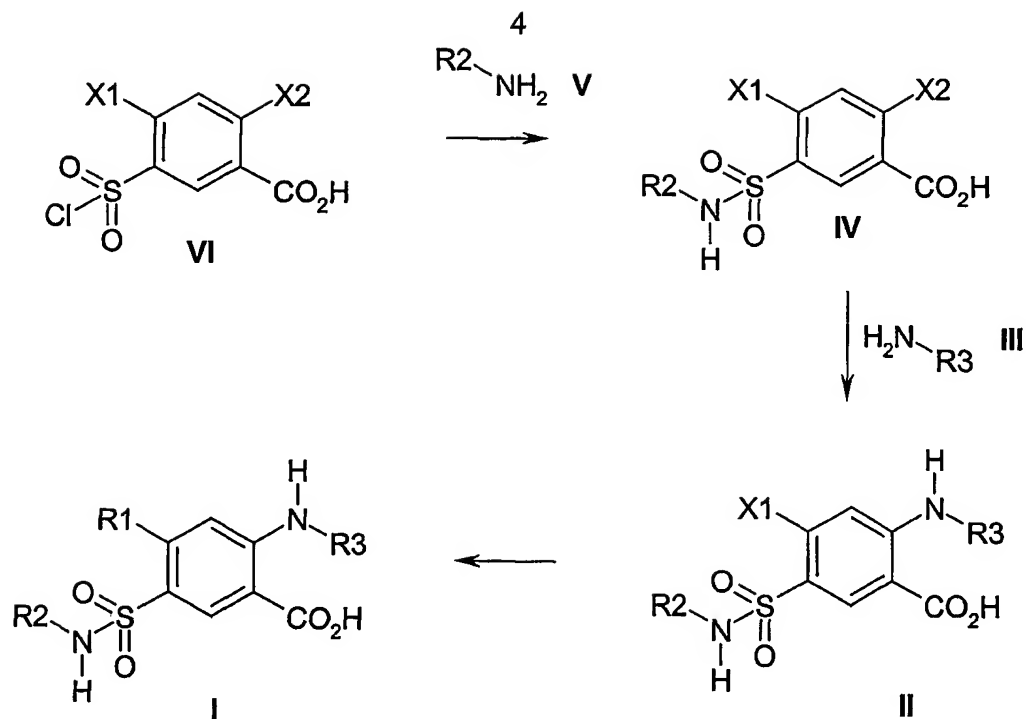
10 Ganz besonders bevorzugt ist die Verbindung

4- Chloro-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure,
sowie ihre pharmazeutisch verträglichen Salze.

15 Enthält einer der Substituenten R(1) bis R(5) ein oder mehrere Asymmetriezentren,
so können diese sowohl S als auch R konfiguriert sein. Die Verbindungen können
als optische Isomere, als Diastereomere, als Racemate oder als Gemische
derselben vorliegen.

Die bezeichneten Alkylreste können sowohl geradkettig wie verzweigt vorliegen.

20 Verbindungen der Formel I lassen sich durch den Fachmann nach aus der Literatur
bekannten Verfahren synthetisieren.



Als mögliche Fluchtgruppen X² (Formel VI) in der nucleophilen aromatischen Substitutionsreaktion mit Aminen III können Fluor oder Chlor in Betracht gezogen werden.

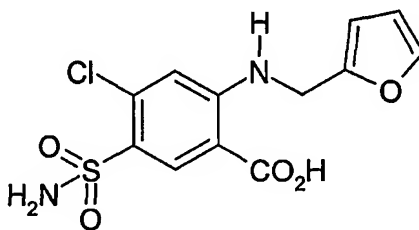
Die Einführung einiger Substituenten in 4-Stellung von Zwischenprodukt II (X¹ gleich Brom, Iod oder -O-SO₂CF₃) gelingt durch ebenfalls literaturbekannte Methoden des Palladium-vermittelten cross-couplings von Arylhalogeniden bzw. Aryltriflaten mit beispielsweise Organostannanen, Organoboronsäuren oder Organoboranen oder Organokupfer- bzw. zinkverbindungen.

Anthranilsäuren I sind im allgemeinen schwache Säuren, die Basen unter Bildung von Salzen binden. Als Baseadditionsprodukte kommen alle pharmakologisch verträglichen Salze infrage, beispielsweise Alkalisalze, Lysinate und Tris-(hydroxymethyl)-methyamin-Salze.

Die Verbindungen I sind substituierte Anthranilsäuren.

5

Ein prominenter Vertreter der Anthranilsäureklasse ist das Furfurylderivat Furosemid, das als Diuretikum in der Therapie Verwendung findet. Furosemid inhibiert den Natrium/Kalium/2Chlor-Cotransporter im aufsteigenden Ast der Henleschen-Schleife in der Niere.



Furosemid

5

In der DE 18 02 208 werden strukturell ähnliche Anthranilsäuren beschrieben, die jedoch an R3 ausschließlich Benzyl, Furfuryl- oder Thienylsubstituenten tragen und diuretische Wirkung besitzen. Im US-Patent 3 565 920 werden Anthranilsäuren beansprucht, die strukturell mit den Verbindungen der Formel I verwandt sind, sich
10 aber ebenfalls durch eine starke salidiuretische Wirksamkeit auszeichnen.

Es war daher überraschend, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen keine unerwünschten und nachteiligen salidiuretischen, jedoch sehr gute cardioprotektive Eigenschaften aufweisen, beispielsweise bei Sauerstoffmangelerscheinungen. Die
15 Verbindungen sind infolge ihrer pharmakologischen Eigenschaften als cardioprotektive Arzneimittel zur Infarktprophylaxe und der Infarktbehandlung sowie zur Behandlung der angina pectoris hervorragend geeignet, wobei sie auch präventiv die pathophysiologischen Vorgänge beim Entstehen ischämisch induzierter Schäden inhibieren oder stark vermindern. Wegen ihrer schützenden Wirkungen
20 gegen pathologische hypoxische und ischämische Situationen können die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I infolge Inhibition des zellulären $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Cotransporters (NBC) als Arzneimittel zur Behandlung aller akuten oder chronischen durch Ischämie ausgelösten Schäden oder dadurch primär oder

sekundär induzierten Krankheiten verwendet werden. Dies betrifft ihre Verwendung als Arzneimittel für operative Eingriffe, z. B. bei Organ-Transplantationen, wobei die Verbindungen sowohl für den Schutz der Organe im Spender vor und während der Entnahme, zum Schutz entnommener Organe beispielsweise bei Behandlung mit

5 oder deren Lagerung in physiologischen Badflüssigkeiten, wie auch bei der Überführung in den Empfängerorganismus verwendet werden können. Die Verbindungen sind ebenfalls wertvolle, protektiv wirkende Arzneimittel bei der Durchführung angioplastischer operativer Eingriffe beispielsweise am Herzen wie auch an peripheren Gefäßen. Darüber hinaus reduzieren die erfindungsgemäßen

10 Verbindungen die Entstehung bzw. das Ausmaß einer Herzinsuffizienz nach verschiedenen Insulten. Entsprechend ihrer protektiven Wirkung gegen ischämisch induzierte Schäden sind die Verbindungen auch als Arzneimittel zur Behandlung von Ischämien des Nervensystems, insbesondere des ZNS, geeignet, wobei sie z.B. zur Behandlung des Schlaganfalls oder des Hirnödems geeignet sind. Darüber hinaus

15 eignen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I ebenfalls zur Behandlung von Formen des Schocks, wie beispielsweise des allergischen, cardiogenen, hypovolämischen und des bakteriellen Schocks.

Darüber hinaus zeichnen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I

20 durch starke inhibierende Wirkung auf die Proliferationen von Zellen, beispielsweise der Fibroblasten- Zellproliferation und der Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen, aus. Deshalb kommen die Verbindungen der Formel I als wertvolle Therapeutika für Krankheiten infrage, bei denen die Zellproliferation eine primäre oder sekundäre Ursache darstellt, und können deshalb als

25 Antiatherosklerotika, Mittel gegen diabetische Spätkomplikationen, Krebserkrankungen, fibrotische Erkrankungen wie Lungenfibrose, Leberfibrose oder Nierenfibrose, Organhypertrophien und -hyperplasien, insbesondere bei Prostatahyperplasie bzw. Prostatahypertrophie verwendet werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Kombination eines NBC-Blockers der Formel I

30 mit Natrium/Wasserstoff-Austausch (NHE)-Inhibitoren. Beide Wirkstoffklassen zeigen in der kombinierten therapeutischen Anwendung überraschenderweise

synergistische Effekte bei der Behandlung von Krankheitsbildern, die auf ischämische Zustände und Reperfusionseignisse zurückzuführen sind. Somit sind die Kombinationen eines NBC-Inhibitors mit einem NHE-Blocker hervorragend zur Infarkt- und Reinfarktprophylaxe und der Infarktbehandlung sowie zur Behandlung

5 der angina pectoris und der Inhibierung ischämisch induzierter Herzarrhythmien, der Tachykardie und der Entstehung und Aufrechterhaltung des Kammerflimmerns geeignet, wobei die Kombinationen auch präventiv die pathophysiologischen Vorgänge beim Entstehen ischämisch induzierter Schäden inhibieren oder stark vermindern. Wegen ihrer verstärkten schützenden Wirkungen gegen pathologische

10 hypoxische und ischämische Situationen können die erfindungsgemäßen Kombinationen infolge verstärkter Inhibierung des Na^+ Einstroms in die Zelle als Arzneimittel zur Behandlung aller akuten oder chronischen, durch Ischämie ausgelösten Schäden oder dadurch primär oder sekundär induzierter Krankheiten verwendet werden. Dies betrifft ihre Verwendung als Arzneimittel für operative

15 Eingriffe, z. B. bei Organtransplantationen, wobei die Kombinationen eines NHE-Inhibitors mit einem Blocker des nicht-inaktivierenden Natriumkanals sowohl für den Schutz der Organe im Spender vor und während der Entnahme, zum Schutz entnommener Organe beispielsweise auch bei deren Lagerung in physiologischen Badflüssigkeiten, wie auch bei der Überführung in den Empfängerorganismus

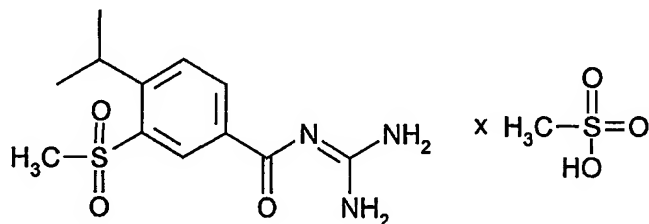
20 verwendet werden können. Die Kombinationen eines NBC-Blockers der Formel I mit NHE-Inhibitoren sind ebenfalls wertvolle, protektiv wirkende Arzneimittel bei der Durchführung angioplastischer operativer Eingriffe beispielsweise am Herzen wie auch an peripheren Gefäßen. Entsprechend ihrer protektiven Wirkung gegen ischämisch induzierte Schäden sind diese Kombinationen auch als Arzneimittel zur

25 Behandlung von Ischämien des Nervensystems, insbesondere des Zentralnervensystems geeignet, wobei sie zur Behandlung des Schlaganfalls oder des Hirnödems geeignet sind. Darüber hinaus eignen sich die erfindungsgemäßen Kombinationen ebenfalls zur Behandlung von Formen des Schocks, wie beispielsweise des allergischen, cardiogenen, hypovolämischen und des bakteriellen

30 Schocks.

8

So wurde beispielsweise überraschend gefunden, dass die Kombination des NBC-Blockers 4-Chloro-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure mit dem NHE-Inhibitor Cariporide mesilat,



- 5 das zum Beispiel in der US-Patentschrift US 5 591 754 beschrieben ist, eine größere als additive, cardioprotektive Wirkung in einem Ischämie/Reperfusions-Modell (isoliert arbeitendes Rattenherz) zeigte.

- Arzneimittel, die eine Verbindung I enthalten, können dabei oral, parenteral,
 10 intravenös, rektal oder durch Inhalation appliziert werden, wobei die bevorzugte Applikation von dem jeweiligen Erscheinungsbild der Erkrankung abhängig ist. Die Verbindungen I können dabei allein oder zusammen mit galenischen Hilfsstoffen zur Anwendung kommen, und zwar sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin.

15

- Welche Hilfsstoffe für die gewünschte Arzneimittelformulierung geeignet sind, ist dem Fachmann auf Grund seines Fachwissens geläufig. Neben Lösemitteln, Gelbildnern, Suppositorien-Grundlagen, Tablettenhilfsstoffen, und anderen Wirkstoffträgern können beispielsweise Antioxidantien, Dispergiermittel,
 20 Emulgatoren, Entschäumer, Geschmackskorrigentien, Konservierungsmittel, Lösungsvermittler oder Farbstoffe verwendet werden.

- Für eine orale Anwendungsform werden die aktiven Verbindungen mit den dafür geeigneten Zusatzstoffen, wie Trägerstoffen, Stabilisatoren oder inerten
 25 Verdünnungsmittel vermischt und durch die üblichen Methoden in die geeigneten Darreichungsformen gebracht, wie Tabletten, Dragees, Steckkapseln, wässrige,

alkoholische oder ölige Lösungen. Als inerte Träger können z. B. Gummi arabicum, Magnesia, Magnesiumcarbonat, Kaliumphosphat, Milchzucker, Glucose oder Stärke, insbesondere Maisstärke, verwendet werden. Dabei kann die Zubereitung sowohl als Trocken- als auch als Feuchtgranulat erfolgen. Als ölige Trägerstoffe oder als
5 Lösemittel kommen beispielsweise pflanzliche oder tierische Öle in Betracht, wie Sonnenblumenöl oder Lebertran.

Zur subkutanen oder intravenösen Applikation werden die aktiven Verbindungen, gewünschtenfalls mit den dafür üblichen Substanzen wie Lösungsvermittler,
10 Emulgatoren oder weiteren Hilfsstoffen in Lösung, Suspension oder Emulsion gebracht. Als Lösungsmittel kommen z. B. in Frage: Wasser, physiologische Kochsalzlösung oder Alkohole, z. B. Ethanol, Propanol, Glycerin, daneben auch Zuckerlösungen wie Glucose- oder Mannitlösungen, oder auch eine Mischung aus den verschiedenen genannten Lösungsmitteln.

15

Als pharmazeutische Formulierung für die Verabreichung in Form von Aerosolen oder Sprays sind geeignet z. B. Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen des Wirkstoffes der Formel I in einem pharmazeutisch unbedenklichen Lösungsmittels, wie insbesondere Ethanol oder Wasser, oder einem Gemisch solcher Lösungsmittel.

20

Die Formulierung kann nach Bedarf auch noch andere pharmazeutische Hilfsstoffe wie Tenside, Emulgatoren und Stabilisatoren sowie ein Treibgas enthalten. Eine solche Zubereitung enthält den Wirkstoff üblicherweise in einer Konzentration von etwa 0,1 bis 10, insbesondere von etwa 0,3 bis 3 Gew.-%.

25

Die Dosierung des zu verabreichenden Wirkstoffs der Formel I und die Häufigkeit der Verabreichung hängen von der Wirkstärke und Wirkdauer der verwendeten Verbindungen ab; außerdem auch von Art und Stärke der zu behandelnden Krankheit sowie von Geschlecht, Alter, Gewicht und individueller Ansprechbarkeit
30 des zu behandelnden Säugers.

Im Durchschnitt beträgt die tägliche Dosis einer Verbindung der Formel I bei einem etwa 75 kg schweren Patienten mindestens 0,001 mg/kg, vorzugsweise 0,01 mg/kg, bis höchstens 10 mg/kg, vorzugsweise 1 mg/kg Körpergewicht. Bei akuten

- 5 Ausbrüchen der Krankheit, etwa unmittelbar nach Erleiden eines Herzinfarkts, können auch noch höhere und vor allem häufigere Dosierungen notwendig sein, z. B. bis zu 4 Einzeldosen pro Tag. Insbesondere bei i.v. Anwendung, etwa bei einem Infarktpatienten auf der Intensivstation können bis zu 200 mg pro Tag notwendig werden.

10

Experimenteller Teil

Liste der Abkürzungen:

	ACN	Acetonitril
15	HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
	LM	Lösungsmittel
	RT	Raumtemperatur
	EE	Ethylacetat (EtOAc)
	Smp	Schmelzpunkt
20	eq.	Äquivalent
	TFA	Trifluoressigsäure
	Rt	Retentionszeit
	MS	Massenspektrometer
	dppf	1,1'-Bis-(diphenylphosphino)-ferrocen

25

Analytik:

HPLC 1Agilent 1100

11

Method Gradient: 10 % ACN(0.1% TFA) / 90% water (0.1% TFA) – auf
- 90 % ACN(0.1% TFA)/ 10%water(0.1% TFA) in 7 min, Fluß 2.5 mL/min
Säule: Altech RP18, 3 µm, 7 x 35 mm

MS: Waters Mass Lynx – ESI-TOF, $[M-H]^+$, 100% Peak, wenn nicht anders
5 angegeben

HPLC 2Agilent 1100 LC/MSD

Method Gradient: 5 % ACN(0.05% TFA) / 95% water (0.05% TFA) – auf
- 95 % ACN (0.05% TFA)/5%water (0.05% TFA) in 4 min, Fluß 0.5 mL/min

10 Säule: ESI, $[M+H]^+$, Merck Purospher RP18, 5 µm, 2 x 55 mm

Allgemeine Vorschrift zur Herstellung von Anthranilsäuren (I / II)

15 Stufe 1: 1.0 eq. der 2,4-Bis-halo-5-chlorsulfonyl-benzoesäure der Formel VI löst bzw.
suspendiert man in Essigsäureethylester (5 ml/mmol) und versetzt sodann mit 5 eq.
Amin der Formel V. Nach Rühren über 17 Stunden bei RT wird das
Reaktionsgemisch mit 2N Salzsäure auf pH 1 bis 2 angesäuert und mit EE
extrahiert. Nach Trocknen über $MgSO_4$ wird das LM evaporiert und das Rohprodukt
20 ohne weitere Reinigung in die nächste Stufe eingesetzt.

Stufe 2: 1.0 eq. des 2,4-Bis-halo-5-sulfamoyl-benzoesäure-Derivats der Formel IV
wird mit 5 eq. Amin der Formel III versetzt und bei 100°C über 24 Stunden erhitzt.
Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wird mit 5N Zitronensäurelösung versetzt
25 und mit EE extrahiert. Die organische Phase wird konzentriert und das erhaltene
Rohprodukt über präparative HPLC (RP-Gel, Laufmittel Acetonitril/Wasser-Gradient)
gereinigt.

Beispiel 1: 4-Chloro-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure,

Lysin-Salz, HPLC2: Rt = 5.252 MS: 525.20

5 Syntheseweg:

a) 4-Chloro-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-chloro-benzoesäure aus Reaktion von 4-Chloro-5-(chlorsulfonyl)-2-chloro-benzoesäure und 4-Fluor-3-chlor-benzylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

10 b) 4-Chloro-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farblose Kristalle.

c) Salzbildung mit 1 eq 1 b), gelöst in Acetonitril, unter Zugabe einer wäßrigen Lösung von 1 eq D,L-Lysin. Nach Gefriertrocknung verbleibt ein farbloser Feststoff.

15

Beispiel 2: 4-Bromo-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure,

HPLC2: Rt = 5.270 MS: 569.00

Syntheseweg:

20 a) 4-Bromo-5-(chlorsulfonyl)-2-chloro-benzoesäure aus 4-Bromo-2-chloro-benzoesäure durch Reaktion in reiner Chlorsulfonsäure (10 eq) bei 95°C innerhalb von 6h. Nach Erkalten wird auf Eis gegossen und der Niederschlag abfiltriert, farbloser Feststoff.

25 b) 4-Bromo-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-chloro-benzoesäure aus 2a) nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

c) 4-Bromo-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure aus b) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

Beispiel 3: 5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure,

HPLC2: Rt = 5.227 MS: 491.40

5 Syntheseweg:

a) 5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure aus 2c) durch Hydrogenolyse mittels 10%-Pd/C-Katalysator in Ethanol bei RT über 2 Tage. Der Katalysator wird abfiltriert und das LM abgezogen. Die Reinigung erfolgt durch präparative RP-HPLC (Wasser/ Acetonitril-Gradient), farbloser Feststoff nach

10 Gefriertrocknung.

Beispiel 4: 4-Methyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure,

15 HPLC2: Rt = 5.199 MS: 505.05

Syntheseweg:

a) 4-Bromo-2-fluoro-benzoesäuremethylester aus 4-Bromo-2-fluoro-benzoesäure durch Veresterung mit einem Überschuss an Acetylchlorid in Methanol bei RT innerhalb 7h. Wässrige Aufarbeitung und anschließende Gefriertrocknung liefert

20 einen farblosen Feststoff.

b) 4-Methyl-2-fluoro-benzoesäuremethylester aus 1 eq 4 a) durch Reaktion mit 2 eq Methylzink-chlorid, hergestellt aus dem entsprechendem Grignard-Reagenz in THF und Zinkchlorid-THF-Komplex, in Gegenwart von 5mol% Pd(dppf)Cl₂ und 6mol% CuI in THF bei RT innerhalb 18 h. Nach NH₄Cl-Aufarbeitung wird mit EE extrahiert,

25 das LM evaporiert, das Rohprodukt über präp. HPLC gereinigt und lyophilisiert, farbloser Feststoff.

c) 4-Methyl-2-fluoro-benzoesäure aus 4 b) durch Hydrolyse mit 2N Natronlauge in Methanol bei 50°C innerhalb einer Stunde. Anschließendes Azidifizieren mit 2N

Salzsäure, Extraktion mit EE und Trocknung über MgSO_4 ergibt ein Rohprodukt, welches in die nächste Stufe eingesetzt wird.

- d) 4-Methyl-5-(chlorsulfonyl)-2-fluoro-benzoesäure aus 4 c) durch Reaktion in reiner Chlorsulfonsäure (10 eq) bei 95°C innerhalb von 6h. Nach Erkalten wird auf Eis gegossen, mit EE extrahiert und über MgSO_4 getrocknet. Evaporation ergibt ein gelbliches Öl, welches in dieser Reinheit weiter umgesetzt wird.
- 5 e) 4-Methyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-fluoro-benzoesäure aus 4 d) und 4-Fluor-3-chlor-benzylamin analog 1 a), farbloser Feststoff.
- 10 f) 4-Methyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure aus 4 e) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.
- 15 Beispiel 5: 4-Isopropyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure,
HPLC2: $R_t = 5.399$ MS: 533.10
Syntheseweg:
- a) 4-Isopropyl-2-fluoro-benzoesäuremethylester aus 1 eq 4 a) durch Reaktion mit 2
20 eq Isopropylzink-chlorid, analog zur Darstellung von 4 a), farbloser Feststoff.
- b) 4-Isopropyl-2-fluoro-benzoesäure aus 5 a) durch Hydrolyse mit 2N Natronlauge, analog 4 c).
- c) 4-Isopropyl-5-(chlorsulfonyl)-2-fluoro-benzoesäure aus 5 b) durch Reaktion in reiner Chlorsulfonsäure analog 4 d).
- 25 d) 4-Isopropyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-fluoro-benzoesäure aus 5 c) und 4-Fluor-3-chlor-benzylamin analog 1 a), farbloser Feststoff.

15

e) 4-Isopropyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure aus 5 d) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

5

Beispiel 6: 4-n-Propyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure,

HPLC2: Rt = 5.437 MS: 533.10

Syntheseweg:

- 10 a) 4- n-Propyl-2-fluoro-benzoesäuremethylester aus 1 eq 4 a) durch Reaktion mit 2 eq n-Propylzink-chlorid, analog zur Darstellung von 4a), farbloser Feststoff.
- b) 4- n-Propyl-2-fluoro-benzoesäure aus 6 a) durch Hydrolyse mit 2N Natronlauge, analog 4 c).
- c) 4- n-Propyl-5-(chlorsulfonyl)-2-fluoro-benzoesäure aus 6 b) durch Reaktion in reiner Chlorsulfonsäure analog 4 d).
- 15 d) 4- n-Propyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-fluoro-benzoesäure aus 6 c) und 4-Fluor-3-chlor-benzylamin analog 1 a), farbloser Feststoff.
- e) 4- n-Propyl-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure aus 6 d) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift,
- 20 Stufe 2, farbloser Feststoff.

Beispiel 7: 4-(4-Methyl-phenyl)-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-Benzoesäure

25 HPLC2: Rt = 5.762 MS: 581.60

aus Reaktion von 1 eq 4-Bromo-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure und 1.2 eq 4-Tolyl-boronsäure in einem LM-Gemisch Toluol/MeOH 2 : 1 in Gegenwart von 10 mol% Pd(OAc)₂, 20 mol%

16

Triphenylphosphin und 3 eq Natriumcarbonat unter Rückfluss für 3 Stunden.

Wässrige Aufarbeitung, anschließende präparative HPLC und Gefriertrocknung liefert einen farblosen Feststoff.

5

Beispiel 8: 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-[(pyridin-4-ylmethyl)-sulfamoyl]-benzoesäure,

HPLC1: Rt = 4.417 MS: 474.1 [M+H⁺]⁺

Syntheseweg:

10 a) 2,4-Dichloro-5-[(pyridin-4-ylmethyl)-sulfamoyl]-benzoesäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoesäure und Pyridin-4-yl-methylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

b) 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-[(pyridin-4-ylmethyl)-sulfamoyl]-benzoesäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser

15 Feststoff.

Beispiel 9: 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-[(pyridin-2-ylmethyl)-sulfamoyl]-benzoesäure

20 HPLC1: Rt = 4.441 MS: 474.1 [M+H⁺]⁺

Syntheseweg:

a) 2,4-Dichloro-5-[(pyridin-2-ylmethyl)-sulfamoyl]-benzoesäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoesäure und Pyridin-2-yl-methylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

25

b) 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-[(pyridin-2-ylmethyl)-sulfamoyl]-benzoesäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

Beispiel 10: 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(3-chloro-benzylsulfamoyl)-benzoesäure

HPLC1: Rt = 5.267 MS: 505.08

5 Syntheseweg:

a) 2,4-Dichloro-5-(3-chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-benzoesäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoesäure und 3-Chloro-benzylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

b) 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(3-chloro-benzylsulfamoyl)-benzoesäure aus a)
10 durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

Beispiel 11: 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(4-sulfamoyl-benzylsulfamoyl)-benzoesäure

15 HPLC1: MS: 550.13

Syntheseweg:

a) 4-Chloro-5-(4-sulfamoyl-benzylsulfamoyl)-benzoesäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoesäure und 4-Sulfamoyl-benzylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

b) 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(4-sulfamoyl-benzylsulfamoyl)-benzoesäure aus
20 a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

25 Beispiel 12: 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(2,3-dichloro-benzylsulfamoyl)-benzoesäure

HPLC1: Rt = 5.368 MS: 539.06

Syntheseweg:

a) 4-Chloro-5-(2,3-Dichloro-benzylsulfamoyl)-benzoesäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoesäure und 2,3-Dichloro-benzylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

- 5 b) 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(2,3-dichloro-benzylsulfamoyl)-benzoesäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

- 10 Beispiel 13: 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(2,4-dichloro-benzylsulfamoyl)-benzoesäure

HPLC1: Rt = 5.433 MS: 539.06

Syntheseweg:

- 15 a) 4-Chloro-5-(2,4-Dichloro-benzylsulfamoyl)-benzoesäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoesäure und 2,4-Dichloro-benzylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

b) 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(2,4-dichloro-benzylsulfamoyl)-benzoesäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

20

Beispiel 14: 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(2-chloro-6-fluor-benzylsulfamoyl)-benzoesäure

HPLC1: Rt = 5.230 MS: 523.11

- 25 Syntheseweg:

a) 4-Chloro-5-(2-chloro-6-fluoro-benzylsulfamoyl)-benzoesäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoesäure und 2-Chloro-6-fluoro-benzylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

b) 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(2-chloro-6-fluoro-benzylsulfamoyl)-benzoesäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

5

Beispiel 15: 4-Chloro-5-[(5-methyl-furan-2-ylmethyl)-sulfamoyl]-2-phenylbutylamino-benzoesäure

HPLC1: Rt = 5.036 MS: 513.19

Syntheseweg:

10 a) 2,4-Dichloro-5-[(5-methyl-furan-2-ylmethyl)-sulfamoyl]-benzoesäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoesäure und 5-Methyl-furan-2-yl-methylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

b) 4-Chloro-5-[(5-methyl-furan-2-ylmethyl)-sulfamoyl]-2-phenylbutylamino-benzoesäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 15 2, farbloser Feststoff.

Beispiel 16: 4-Chloro-5-[2-(4-chloro-phenyl)-ethylsulfamoyl]-2-phenylbutylamino-benzoesäure

20 HPLC1: Rt = 5.453 MS: 519.14

Syntheseweg:

a) 2,4-Dichloro-5-[2-(4-chloro-phenyl)-ethylsulfamoyl]-benzoesäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoesäure und 2-(4-Chloro-phenyl)-ethylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

25 b) 4-Chloro-5-[2-(4-chloro-phenyl)-ethylsulfamoyl]-2-phenylbutylamino-benzoesäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

Beispiel 17: 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(2-thiophen-2-yl-ethylsulfamoyl)-benzoesäure

HPLC1: Rt = 5.253 MS: 491.10

5 Syntheseweg:

a) 2,4-Dichloro-5-(2-thiophen-2-yl-ethylsulfamoyl)-benzoesäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoesäure und 2-Thiophen-2-yl-ethylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.

- 10 b) 4-Chloro-2-phenylbutylamino-5-(2-thiophen-2-yl-ethylsulfamoyl)-benzoesäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

- 15 Beispiel 18: 4-Chloro-5-(4-ethyl-phenylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure

HPLC1: Rt = 5.358 MS: 485.17

Syntheseweg:

a) 2,4-Dichloro-5-(4-ethyl-phenylsulfamoyl)-benzoesäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoesäure und 4-Ethyl-anilin nach allg. Vorschrift, Stufe

20 1.

b) 4-Chloro-5-(4-ethyl-phenylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

- 25 Beispiel 19: 4-Chloro-5-(phenylbutylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure

HPLC1: Rt = 5.511 MS: 523.11

aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoesäure mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

- 5 Beispiel 20: 4-Chloro-5-(cyclohexylmethyl-sulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure

HPLC1: Rt = 5.548 MS: 475.10

Syntheseweg:

- 10 a) 2,4-Dichloro-5-(cyclohexylmethyl-sulfamoyl)-benzoesäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoesäure und Cyclohexylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.
- b) 4-Chloro-5-(cyclohexylmethyl-sulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

15

Beispiel 21: 4-Chloro-5-(isobutyl-sulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure

HPLC1: Rt = 5.208 MS: 437.10

Syntheseweg:

- 20 a) 2,4-Dichloro-5-(isobutyl-sulfamoyl)-benzoesäure aus Reaktion von 2,4-Dichloro-5-(chlorsulfonyl)-benzoesäure und Isobutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 1.
- b) 4-Chloro-5-(isobutyl-sulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure aus a) durch Reaktion mit Phenylbutylamin nach allg. Vorschrift, Stufe 2, farbloser Feststoff.

- 25 Pharmakologischer Teil:

Beschreibung der NBC-Aktivitätsmessungen:

Die meisten der molekularbiologischen Techniken folgen Protokollen aus den Werken "Current Protocols in Molecular Biology (eds. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K.; John Wiley & Sons)" bzw. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.; Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))". Zunächst wurde die Herzform des humanen NBC1 durch RT-PCR kloniert. Nach Bestätigung der Sequenz wurden die entsprechenden cDNAs in den Vektor pcDNA3.1+ einkloniert, der als Selektionsmarker für eukaryote Zellen das neo-Gen enthält. Für die Amplifikation der humanen Herzform des NBC1 wurde humane Herz-mRNA (Fa. Clontech, Palo Alto, CA, USA) mit Primern amplifiziert, die den Bereich abdecken, in dem sich die Herzform von der Nierenform unterscheidet. Die Herzform unterscheidet sich dabei nur am 5'-Ende der codierenden Sequenz. Der für die ersten 41 Aminosäuren der Nierenform codierende Bereich ist in der Herzform durch einen für 85 Aminosäuren codierenden Bereich ersetzt (Positionen 118 – 370 aus Abukadze et al., J. Biol. Chem. 273, 17689 - 17695 (1998) bzw. Positionen 45 – 294 aus Choi et al., Am. J. Physiol. Cell Physiol. 276, C576-C584 (1999) ersetzen Positionen 150 – 270 aus Burnham et al. (s.o.), J. Biol. Chem. 272, 19 111 - 19 114 (1997) umfassen. Das Produkt der PCR-Reaktion wurde zunächst in den Vektor pCR2.1 kloniert und nach Verifizierung der Sequenz mittels durch die PCR-Reaktion eingeführter Schnittstellen in die cDNA der Nierenform des NBC1 einkloniert. Das erhaltene Konstrukt wurde durch Sequenzierung auf korrekten Einbau der humanen Herz NBC1-cDNA überprüft. Die erhaltenen Plasmide für die Herzform des humanen NBC1 wurden mittels des LipofectAmine™ Reagent der Firma LifeTechnologies (Gaithersburg, MD, USA) in die Zelllinie CHO K1 (Ovarzellen des Chinesischen Hamsters) transfiziert, die keine messbare NBC-Aktivität aufweist. Nach Selektion auf transfizierte Zellen über Wachstum in G418-haltigem Medium (nur Zellen, die durch Transfektion ein neo-Gen erhalten haben, können unter diesen Bedingungen überleben) wurden einzelne Zellen isoliert und kultiviert. Mit dem unten beschriebenen Test wurden am FLIPR Zellklone identifiziert, die eine deutliche NBC-Aktivität aufweisen. Die besten Zelllinien wurden für die weiteren Tests verwendet und zur Vermeidung eines Verlustes der transfizierten Sequenz unter ständigem Selektionsdruck in G418-haltigem Medium kultiviert.

- Zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der Wirkstoffe auf die Herzform des humanen NBC1 wurde ein Test aufgebaut, der eine Weiterentwicklung des für das Testen von Inhibitoren des NCBE (Na^+ -abhängiger $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher) aufgebauten Assays (EP 0 903 339) auf Basis der "Acid Load" Methode (Sardet et al., Cell 56, 271 - 280 (1989); Faber et al., Cell. Physiol. Biochem. 6, 39 - 49 (1996) darstellt. In diesem Test wird die Erholung des intrazellulären pHs (pH_i) nach einer vorhergehenden Ansäuerung unter Bedingungen ermittelt, bei denen der NBC aktiv ist, die anderen pH_i regulierenden Systeme der CHO-Zellen wie NHE (Na^+/H^+ -Austauscher) und NCBE (Na^+ -abhängiger $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher) durch spezifische Inhibitoren aber blockiert sind. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die beobachtete Erholung des intrazellulären pH auf der Aktivität des NBC1 beruht.

Durchführung der Messungen

- Am Vortag werden die transfizierten Zellen auf 96-Well Mikrotiterplatten in einer Dichte von ca. 15.000 Zellen/Well in 200 μl Wachstumsmedium ausgesät und über Nacht bei 37°C im CO_2 -Brutschrank inkubiert. Der intrazelluläre pH der transfizierten Zellen mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BCECF (Molecular Probes (Eugene, OR, USA), eingesetzt wird die Vorstufe BCECF-AM) bestimmt. Die Zellen werden zunächst mit BCECF-AM beladen. Das Wachstumsmedium der am Vortag ausgesäten Zellen wird manuell abgenommen, da das im Medium vorhandene fötale Kälberserum die BCECF-Färbung stören könnte. Zur Färbung werden zu den Zellen eines jeden Wells 100 μl NH_4Cl -Färbepuffer (20 mM NH_4Cl , 115 mM NaCl, 1 mM MgSO_4 , 1 mM CaCl_2 , 5 mM KCl, 20 mMHEPES, 5 mM Glucose; pH mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt) gegeben, der 5 μM BCECF-AM enthält. Die Zellen werden 20 Minuten bei 37°C im CO_2 -Brutschrank mit dieser Färbelösung inkubiert. Während dieser Zeitspanne reichern sich zum einen NH_4^+ -Ionen in den Zellen an, was eine leichte Alkalisierung hervorruft, zum anderen gelangt BCECF-AM in die Zellen, wo durch Wirkung von Esterasen der Farbstoff BCECF, der nicht zellmembranpermeabel ist, aus BCECF-AM freigesetzt wird. Zur Ansäuerung der

Zellen werden diese anschließend im Zellwascher gründlich (dreimaliges Waschen mit einem Gesamtvolumen von 1,2 ml pro Well) mit einem Na⁺- und NH₄⁺-freien Waschpuffer gewaschen (133,8 mM Cholinchlorid, 4,7 mM KCl, 1,25 mM CaCl₂, 1,25 mM MgCl₂, 0,97 mM K₂HPO₄, 0,23 mM KH₂PO₄, 5 mM HEPES, 5 mM

5 Glucose; pH mit 1 M KOH auf 7,4 eingestellt). Dieser Waschriff führt zu einem drastischen Abfall des intrazellulären pHs (~6,3-6,4). Da der Waschpuffer aber weder Natrium- noch Bicarbonationen enthält, sind die Zellen nicht in der Lage ihren intrazellulären pH zu regulieren. Die eigentliche Messung der intrazellulären pH-Erholung findet im sogenannten FLIPR (Fluorescence Imaging Plate Reader) der

10 Firma Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA) statt. Der FLIPR besitzt einen Argonlaser, dessen 488 nm Bande sich sehr gut zur Anregung des BCECFs eignet. Durch eine komplizierte Strahlenführung wird erreicht, dass alle 96 Wells einer Mikrotiterplatte gleichzeitig angeregt und somit gleichzeitig gemessen werden können. Durch die besondere Konstruktionsweise des FLIPRs werden nur die

15 unteren 50 µm in jedem Well angeregt, weshalb man bevorzugt mit adhären Zellen wie z.B. CHO arbeitet. Das von den angeregten Zellen emittierte Licht gelangt zunächst über einen Filter, der zwischen 510 und 570 nm durchlässig ist, und wird dann mittels einer CCD-Kamera registriert. Da der FLIPR auch einen eingebauten 96-Spitzen-Pipettor enthält, kann man in alle 96 Wells einer Mikrotiterplatte

20 gleichzeitig das gleiche Volumen einer beliebigen Flüssigkeit pipettieren. Etwa jede Sekunde kann man eine Gesamtmessung einer vollständigen Mikrotiterplatte durchführen. Im FLIPR wird zu den nach dem Waschen angesäuerten Zellen jeweils 180 µl Substanzpuffer (90 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 25 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0,8 mM K₂HPO₄, 0,2 mM KH₂PO₄, 10 mM HEPES, 5 mM Glucose; am

25 Tag der Messung wird 5 Sekunden reines CO₂ durchgeleitet und der pH anschließend mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt; das CO₂-Durchleiten kann aber auch entfallen, ohne dass sich die Messergebnisse merkbar ändern) hinzupipettiert. Um die unter diesen Pufferbedingungen ebenfalls aktiven pH-Regulationssysteme NHE und NCBE zu hemmen, enthält der Substanzpuffer zusätzlich noch spezifische

30 Inhibitoren dieser Austauscher. Die Endkonzentration des NHE-Inhibitors Cariporide mesilat (EP 589 336) beträgt 10 µM, die des NBCE-Inhibitors nach EP 855 392

25

Beispiel 1: 2-Butyl-5-methylsulfanyl-3-(2'-cyanaminosulfonyl-biphenyl-4-ylmethyl)-
3H-imidazol-4-carbonsäure-ethylester 30 µM. Nach Zugabe von Substanzpuffer
steigt der intrazelluläre pH der zuvor angesäuerten Zellen durch die Aktivität des
NBC an, was sich in einer Fluoreszenzzunahme des pH- sensitiven Farbstoffes
5 bemerkbar macht.

Die inhibitorische Wirkung einer Substanz wird nun bestimmt, indem man den
Fluoreszenzanstieg, der sich linear zum pH-Anstieg verhält, unter Einfluss dieser
Substanz mit dem von Wells vergleicht, bei denen der NBC ungehemmt ist [100%
Aktivität, nur Zugabe von Cariporide mesilat und des NCBE- Blockers nach EP 855
10 392. Beispiel 1] bzw. völlig gehemmt ist [0% Aktivität, neben Cariporide mesilat und
NCBE-Blocker nach EP 855 392, Bsp. 1, noch Zugabe von 400 µM DCDPC, 4-
Chloro-2-(3-chloro-phenylamino)-benzoesäure].

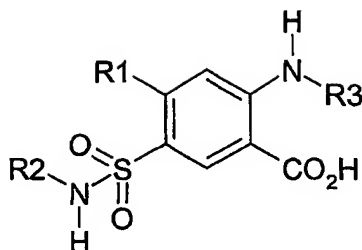
Die gesamte Messung einer Mikrotiterplatte dauert zwei Minuten, wobei die gesamte
15 Platte alle 2 Sekunden gemessen wird. Nach den ersten 5 Messungen werden die
jeweils 180 µl Substanzpuffer, die die zu testenden Verbindungen enthalten, mit
einer Geschwindigkeit von 60 µl pro Sekunde zu den angesäuerten Zellen pipettiert.
Nach wenigen Sekunden bereits zeigt sich in Wells, in denen der NBC nicht
gehemmt wird, eine deutliche Fluoreszenzzunahme. Der Bereich zwischen 20 und
20 80 Sekunden, in dem die Fluoreszenzzunahme in den Positivkontrollen linear
verläuft, wird zur Berechnung der verbleibenden NBC-Aktivität betrachtet. Von den
96 Wells der Mikrotiterplatte werden jeweils 8 für den 100%- bzw. den 0%-Wert
verwendet.

Die folgenden Daten beziehen sich auf die Restaktivität bei einer Inhibitor-
25 Konzentration von 10µM und sind Resultat von Doppelbestimmungen. .

Ergebnisse:		26 [%] at 10µM
5	Beispiel 1	46
	2	56
	3	88
	4	54
	5	78
10	6	69
	7	95
	8	89
	9	89
	10	75
15	11	81
	12	37
	13	60
	14	87
	15	79
20	16	91
	17	95
	18	79
	19	77
	20	89
	21	94

Patentansprüche

1. Anthranilsäuren der Formel I



5 worin bedeuten:

R(1) H, Cl, Br, I, CN, (C₁-C₈)- Alkyl, (C₃-C₆)- Cycloalkyl oder Phenyl,

wobei der aromatische Kern unsubstituiert oder substituiert ist mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, (C₁-C₃)- Alkyl, Methoxy oder -(CF₂)_a-CF₃;

10 a Null, 1, 2 oder 3;

R(2) (C₁-C₈)- Alkyl, -C_bH_{2b}- (C₃-C₆)- Cycloalkyl, -C_bH_{2b}- Phenyl, -C_bH_{2b}- Pyridinyl, -C_bH_{2b}- Thiophenyl, -C_bH_{2b}- Furanyl,

wobei die aromatischen Systeme unsubstituiert oder substituiert sind mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)-Alkyl, Methoxy oder -SO₂NR(4)R(5);

15 R(4) und R(5) unabhängig voneinander H, (C₁-C₄)-Alkyl,

b Null, 1, 2, 3 oder 4;

R(3) -C_dH_{2d}- Phenyl,

wobei der aromatische Kern unsubstituiert oder substituiert ist mit 1-3 Substituenten aus der Gruppe F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl oder Methoxy;

20 d 3 oder 4;

sowie deren pharmazeutisch verträgliche Salze.

2. Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1, in denen bedeuten:

R(1) Cl, (C₁-C₄)- Alkyl oder Phenyl,

wobei der aromatische Kern unsubstituiert oder substituiert ist mit 1-
3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus F, Cl,
5 CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl oder Methoxy;

R(2) (C₁-C₄)- Alkyl, -C₆H_{2b}- Cyclohexyl, -C₆H_{2b}- Phenyl, -C₆H_{2b}- Pyridinyl, -
C₆H_{2b}- Thiophenyl, -C₆H_{2b}- Furanyl,

wobei die aromatischen Systeme unsubstituiert oder substituiert sind
mit 1 - 3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
10 F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)-Alkyl, Methoxy oder -SO₂NH₂;

b Null, 1 oder 2;

R(3) -n-C₄H₈- Phenyl,

wobei das Phenyl unsubstituiert ist oder substituiert mit 1 - 3 Substituenten
ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl oder
15 Methoxy;

sowie deren pharmazeutische verträgliche Salze.

3. Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass darin
bedeuten:

20 R(1) Cl, (C₁-C₄)- Alkyl oder Phenyl;

wobei der aromatische Kern unsubstituiert oder substituiert ist mit 1-
3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus F, Cl,
CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl oder Methoxy;

R(2) (C₁-C₄)- Alkyl, -C₆H_{2b}- Cyclohexyl, -C₆H_{2b}- Phenyl, -C₆H_{2b}- Pyridinyl, -
25 C₆H_{2b}- Thiophenyl, -C₆H_{2b}- Furanyl;

wobei die aromatischen Systeme unsubstituiert oder substituiert sind
mit 1 - 3 Substituenten ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
F, Cl, CF₃, (C₁-C₃)- Alkyl, Methoxy oder -SO₂NH₂;

b 1;

R(3) -n-C₄H₈- Phenyl,

sowie deren pharmazeutisch verträgliche Salze.

4. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie 4- Chloro-5-(3-
5 chloro-4-fluoro-benzylsulfamoyl)-2-phenylbutylamino-benzoesäure ist;
sowie ihre pharmazeutisch verträglichen Salze.

5. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines
Medikaments zur Behandlung von Arrhythmien.

10

6. Methode zum Behandeln von Arrhythmien, dadurch gekennzeichnet, dass
man eine wirksame Menge einer Verbindung I nach Anspruch 1 mit den
üblichen Zusatzstoffen versetzt und in einer geeigneten Darreichungsform
verabreicht.

15

7. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines
Medikaments zur Behandlung oder Prophylaxe des Herzinfarkts.

8. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines
20 Medikaments zur Behandlung oder Prophylaxe der Angina Pectoris.

9. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines
Medikaments zur Behandlung oder Prophylaxe von ischämischen Zuständen
des Herzens.

25

10. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines
Medikaments zur Behandlung oder Prophylaxe von ischämischen Zuständen
des peripheren und zentralen Nervensystems und des Schlaganfalls.

11. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Prophylaxe von ischämischen Zuständen peripherer Organe und Gliedmaßen.
- 5 12. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Schockzuständen.
13. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zum Einsatz bei chirurgischen Operationen und
- 10 Organtransplantationen.
14. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Konservierung und Lagerung von Transplantaten für chirurgische Maßnahmen.
- 15 15. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch I zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krankheiten, bei denen die Zellproliferation eine primäre oder sekundäre Ursache darstellt
- 20 16. Verwendung einer Verbindung I nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung oder Prophylaxe von Störungen des Fettstoffwechsels.
17. Heilmittel, enthaltend eine wirksame Menge einer Verbindung I nach
- 25 einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Interr Application No
 PC1/EP 01/13681

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

 IPC 7 C07C311/39 C07D213/42 C07D307/52 C07D333/20 A61K31/18
 A61P9/10 A61P25/28 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07C C07D A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BEILSTEIN Data, WPI Data, EPO-Internal, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 726 250 A (HOECHST) 14 August 1996 (1996-08-14) page 3; claims ----	1,5-7,9, 12,17
A	EP 0 604 852 A (HOECHST) 6 July 1994 (1994-07-06) page 3; claims ----	1,5-9, 15,17
A	DE 18 02 208 A (HOECHST) 14 May 1970 (1970-05-14) cited in the application page 1; examples ----	1,17
A	US 3 565 920 A (L.H. WERNER) 23 February 1971 (1971-02-23) cited in the application column 3; examples -----	1,17



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 March 2002

Date of mailing of the international search report

05/04/2002

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

English, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

nation on patent family members

Intern Application No

PCT/EP 01/13681

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0726250	A	14-08-1996	DE 19504379 A1	14-08-1996
			AT 197291 T	15-11-2000
			AU 700883 B2	14-01-1999
			AU 4442996 A	22-08-1996
			BR 9600370 A	03-03-1998
			CA 2169219 A1	11-08-1996
			CN 1137519 A ,B	11-12-1996
			CZ 9600382 A3	14-08-1996
			DE 59606062 D1	07-12-2000
			DK 726250 T3	08-01-2001
			EP 0726250 A1	14-08-1996
			ES 2152440 T3	01-02-2001
			FI 960587 A	11-08-1996
			HR 960063 A1	31-10-1997
			HU 73975 A2	28-10-1996
			JP 8245553 A	24-09-1996
			NO 960529 A	12-08-1996
			NZ 280954 A	28-10-1996
			PL 312531 A1	19-08-1996
			PT 726250 T	30-03-2001
			RU 2155750 C2	10-09-2000
			SI 9600040 A ,B	31-10-1996
			SK 17596 A3	01-10-1996
			TR 960747 A2	21-08-1996
			TW 419457 B	21-01-2001
			US 5607976 A	04-03-1997
			ZA 9601050 A	29-08-1996
EP 0604852	A	06-07-1994	AU 5271693 A	07-07-1994
			CA 2112194 A1	29-06-1994
			EP 0604852 A1	06-07-1994
			FI 935825 A	29-06-1994
			JP 6234730 A	23-08-1994
			NO 934836 A	29-06-1994
DE 1802208	A	14-05-1970	DE 1802208 A1	14-05-1970
			BE 740088 A	10-04-1970
			ES 372003 A1	16-01-1972
			FR 2068542 A1	27-08-1971
			NL 6913768 A	14-04-1970
US 3565920	A	23-02-1971	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. - Aktenzeichen

PCT/EP 01/13681

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07C311/39 C07D213/42 C07D307/52 C07D333/20 A61K31/18
 A61P9/10 A61P25/28 A61P35/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07C C07D A61K A61P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BEILSTEIN Data, WPI Data, EPO-Internal, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	EP 0 726 250 A (HOECHST) 14. August 1996 (1996-08-14) Seite 3; Ansprüche	1,5-7,9, 12,17
A	EP 0 604 852 A (HOECHST) 6. Juli 1994 (1994-07-06) Seite 3; Ansprüche	1,5-9, 15,17
A	DE 18 02 208 A (HOECHST) 14. Mai 1970 (1970-05-14) in der Anmeldung erwähnt Seite 1; Beispiele	1,17
A	US 3 565 920 A (L.H. WERNER) 23. Februar 1971 (1971-02-23) in der Anmeldung erwähnt Spalte 3; Beispiele	1,17

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. März 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

05/04/2002

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

English, R

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung

zur selben Patentfamilie gehören

Intern: 3 Aktenzeichen

PCT/EP 01/13681

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0726250	A	14-08-1996	DE 19504379 A1 14-08-1996
			AT 197291 T 15-11-2000
			AU 700883 B2 14-01-1999
			AU 4442996 A 22-08-1996
			BR 9600370 A 03-03-1998
			CA 2169219 A1 11-08-1996
			CN 1137519 A ,B 11-12-1996
			CZ 9600382 A3 14-08-1996
			DE 59606062 D1 07-12-2000
			DK 726250 T3 08-01-2001
			EP 0726250 A1 14-08-1996
			ES 2152440 T3 01-02-2001
			FI 960587 A 11-08-1996
			HR 960063 A1 31-10-1997
			HU 73975 A2 28-10-1996
			JP 8245553 A 24-09-1996
			NO 960529 A 12-08-1996
			NZ 280954 A 28-10-1996
			PL 312531 A1 19-08-1996
			PT 726250 T 30-03-2001
			RU 2155750 C2 10-09-2000
			SI 9600040 A ,B 31-10-1996
			SK 17596 A3 01-10-1996
			TR 960747 A2 21-08-1996
			TW 419457 B 21-01-2001
			US 5607976 A 04-03-1997
			ZA 9601050 A 29-08-1996
EP 0604852	A	06-07-1994	AU 5271693 A 07-07-1994
			CA 2112194 A1 29-06-1994
			EP 0604852 A1 06-07-1994
			FI 935825 A 29-06-1994
			JP 6234730 A 23-08-1994
			NO 934836 A 29-06-1994
DE 1802208	A	14-05-1970	DE 1802208 A1 14-05-1970
			BE 740088 A 10-04-1970
			ES 372003 A1 16-01-1972
			FR 2068542 A1 27-08-1971
			NL 6913768 A 14-04-1970
US 3565920	A	23-02-1971	KEINE